

11.11.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 0 月    2 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 4 4 7 8 6  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 3 - 3 4 4 7 8 6 ]

REC'D 02 DEC 2004	
WIPO	PCT

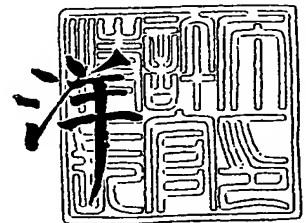
出 願 人                      株式会社資生堂  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 1033906  
【提出日】 平成15年10月 2日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 A61K 67/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 青木 宏文  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（新横浜）内  
    【氏名】 長谷川 聖高  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-1 2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター（金沢八景）内  
    【氏名】 茂呂 修  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000001959  
    【氏名又は名称】 株式会社資生堂  
【代理人】  
    【識別番号】 100099759  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 青木 篤  
    【電話番号】 03-5470-1900  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100077517  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 石田 敬  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100087413  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 古賀 哲次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100117019  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 渡辺 陽一  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100082898  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 西山 雅也  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 209382  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0305959

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、M c p 9 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9)、M c p 10 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10)、I s g 15 (Interferon-stimulated protein (15kDa) isg15(Ubiquitin-like))、U s p 18 (ubiquitin specific protease 18)、O a s 12 (2'-5' oligoadenylate synthase-like OASL2 (IFN induced))、G b p 2 (IFN induced guanylate nucleotide binding protein 2 gbp2(antivirus))、G t p i (G T P a s e ; interferon-g induced GTPase(19440))、I f i 47 (interferon gamma inducible protein, 47kDa (GTP-binding motif))、I g t p (G T P a s e ; interferon gamma induced GTPase igtp)) 及び T g t p (G T P a s e ; T-cell specific GTPase (IFN gamma)) から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

## 【請求項 2】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、S p r r 2 A (small proline-rich protein 2A)、K r t 2-6 b (keratin complex 2, basic, gene 6a)、C d k 5 r a p 2 (CKK5 regulatory subunit associated protein 2)、M e f 2 C (myocyte enhancer factor 2C)、G s t a 4 (glutathione S-transferase, alpha 4)、O s f 2 (osteoblast specific factor (fascilin I-like))、T n c (Tenascin C)、I g f b p 6 (insulin-like growth factor binding protein 6) 及び P p i c a p (peptidylprolyl isomerase C (cyclophylin C)-associated protein) から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

## 【請求項 3】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、M C P-6 (Mast cell protease 6) タンパク質の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

## 【請求項 4】

前記皮膚しみ形成が U V B 照射を原因とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の方法

## 【請求項 5】

前記表皮中の前記遺伝子の発現の亢進が、表皮から抽出された前記タンパク質をコードする mRNA の量を測定することにより決定される、請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の方法

## 【請求項 6】

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を請求項 1～3 のいずれか 1 項に規定する遺伝子の発現及び／又は当該遺伝子のタンパク質産物の活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

## 【請求項 7】

更に、前記阻害能力を有するインヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm. 74656) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法。

**【請求項 9】**

前記皮膚しみ形成が UVB 照射を原因とする、請求項 8 記載の方法。

**【請求項 10】**

前記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進が、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性の mRNA の量を測定することにより決定される、請求項 8 又は 9 記載の方法。

**【請求項 11】**

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm. 74656) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法。

**【請求項 12】**

更に、前記阻害能力を有する前記インヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る、請求項 11 記載の方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】しみ部位亢進遺伝子群を指標とした皮膚しみ形成予知方法、皮膚しみ形成抑制剤のスクリーニング方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

紫外線やホルモンのアンバランス、精神的ストレスなどによりメラノサイト（色素形成細胞）内の酵素チロシナーゼの働きが異常に活性化されると、メラニン色素が次々とつくりだされて周辺の表皮細胞に送られてしまう。メラニン色素のつくりだされるペースが速く、また紫外線等の影響でターンオーバーが正常でなくなると、メラニン色素が外へ排出されず、肌に残ってしまい、その結果肌にしみができてしまうものと考えられる。

## 【0003】

しみができてしまったら、できるだけ早くその手入れをすることが好ましく、そのために美容技術者による視感（視覚）によるしみの官能評価や、皮膚状態の撮像装置、測色計等の機器を用いるしみの定量的評価により、しみの有無の早期判定が望まれる（特開 2003-144393 号公報）。

## 【0004】

一旦しみができてしまうと、その除去は容易ではなく、肌の新陳代謝を良くして不要なメラニンを早く追い出し、余計なメラニンを作らないようにするなどの手入れが必要となる。従って、しみができる前に肌の手入れを行うことが好ましい。しかしながら、しみのでき易さには個体差があり、またその原因となる条件も様々であるため、しみができることを予知することは一般に困難である。よって、しみができる前にしみができ易い状態であるか否かを予知できる手段があればしみ予防対策として極めて有効である。

【非特許文献 1】 M. Naganuma et al., Journal of Dermatological Science 25(2001)29-35

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明者は上記問題を鑑み、肌にしみができる前に肌がしみのでき易い状態であるか否かを予知できる手段を提供できるかを鋭意検討した。そして、本発明者は紫外線照射を施したのち照射をやめて日焼け様呈色が退色した後、しばらくして老人性色素斑様のスポット状色素斑を形成するしみモデルマウス（M. Naganuma et al., Journal of Dermatological Science 25(2001) 29-35）のしみ部位の表皮由来の RNA のマイクロアレイ解析の結果、紫外線を照射せず、スポット状色素斑の形成していない非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮において下記の遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。従って、ヒトの表皮において、下記の遺伝子の発現を調べることで、しみ形成し易い皮膚であると判断することが可能であることが明らかとなった。

（1）インターフェロンにより発現の亢進されることの知られる遺伝子群

## a) ケモカイン系

Mc p 9 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9) [Arthritis Rheum 2002 Oct;46(10):2730-41];

Mc p 10 (small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10) [J Immunol. 2002 Apr 1;168(7):3195-204];

## b) シグナル伝達系

I s g 1 5 (Interferon-stimulated protein (15kDa) isg15(Ubiquitin-like)) [Genes Dev 2003 Feb 15; 17(4):455-460];

U s p 1 8 (ubiquitin specific protease 18) [J. Biol. Chem. 2002 Mar 22; 277(12):9976-9981]

## c) 抗ウイルス系

O a s 1 2 (2'-5' oligoadenylate synthase-like OASL2 (IFN induced)) [J. Interferon Cytokine Res 2002 Sep; 22(9):981-993];

G b p 2 (IFN induced guanylate nucleotide binding protein 2 gbp2(antivirus)) [J. Interferon Cytokine Res 1998 Nov; 18(11):977-985];

G t p i (G T P a s e ; interferon-g induced GTPase(19440)) ;

I f i 4 7 (interferon gamma inducible protein, 47kDa (GTP-binding motif)) [J Immunol. 1992 May 15;148(10):3275-81];

I g t p (G T P a s e ; interferon gamma induced GTPase igtp)) [Infect Immun. 2002 Dec;70(12):6933-9];

T g t p (G T P a s e ; T-cell specific GTPase(IFN gamma)) J Leukoc Biol. 1995 Mar;57(3):477-83]

## 【0006】

インターフェロンにより発現の亢進される遺伝子のプロモーター領域にはインターフェロン反応性エレメントが存在し、これにリン酸化により活性化されたS T A T-1 (signal transducers and activators of transcription)が結合することでこれら遺伝子の発現が亢進される (Free Radical Biology & Medicine 2000;28(9):1430-1437, Exp Dermatol 1999;8:96-108)。従って、上記遺伝子はリン酸化されることで活性化されたリン酸化S T A T-1の存在下で発現の亢進される遺伝子群であるともいえよう。そして実際図1に示すように、リン酸化S T A T-1もしみ部位において高い発現をしていることを今回示している。

## 【0007】

## (2) 機能既知のその他の遺伝子群

## a) ケラチン系

S p r r 2 A (small proline-rich protein 2A) [Mamm. Genome 2003;14 (2): 140-148];

K r t 2-6 b (keratin complex 2, basic, gene 6a) [Genomics 1998; 53 (2):170-183]

## b) セルサイクル系

C d k 5 r a p 2 (CKK5 regulatory subunit associated protein 2) [Neuron. 2003 Apr 10;38(1):33-46];

M e f 2 C (myocyte enhancer factor 2C) [Brain Res Mol Brain Res. 2001 Dec 16; 97(1):70-82]

## c) 酸化還元系

G s t a 4 (glutathione S-transferase, alpha 4) [J. Biol. Chem. 2002 May 17; 277(20):17892-17900]

## d) 骨系

O s f 2 (osteoblast specific factor (fascin I-like)) [Protein Expr Purif 1995 Jun; 6(39): 305-311]

## e) 細胞外マトリックス (ECM) 系

T n c (Tenascin C) [Matrix Biol 2000 Dec; 19(7):581-596]

## f) インシュリン系

I g f b p 6 (insulin-like growth factor binding protein 6) [Mol. Cell. Endocrinol. 1994;104 (1): 57-66]

## g) サイクロスポリン系

P p i c a p (peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)-associated protein) [Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6815-9]

M C P-6 (Mast cell protease 6) [J. Biol. Chem. 1991 Feb 25; 266(6):3847-3853]。

## (3) 機能未知の遺伝子群

Mm. 74656 遺伝子 (GenBank Acc:AA519023)

【0008】

上記遺伝子のいずれも、皮膚色素関連の報告は存在しない。従って、しみとの関係でこれら遺伝子の発現が亢進されることは極めて驚くべき事実である。

【課題を解決するための手段】

【0009】

第一の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、リン酸化STAT-1 (signal transducers and activators of transcription) 及びインターフェロンの存在下で発現の亢進される表皮中の遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする。ここで、しみとは、皮膚に現われる茶褐色ないし濃褐色の平面状斑紋をいう(広辞苑)。なかでも今回のシミモデルマウスについて表記するしみは、主に老人性色素斑様の色素斑をさす。

【0010】

好適な態様において、リン酸化STAT-1 及びインターフェロンの存在下で発現の亢進される表皮中の遺伝子はMcp9、Mcp10、Isg15、Usp18、Oas12、Gbp2、Gtpi、Ifi47、Igt p 及びTgt p から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子である。

【0011】

第二の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、Sprr2A、Krt2-6b、Cdk5rap2、Mef2C、Gsta4、Osf2、Tnc、Igfbp6 及びPpicap から成る群から選ばれるタンパク質をコードする遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断する方法を提供する。

【0012】

第三の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、MCP-6 (Mast cell protease 6) タンパク質の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断する方法を提供する。

【0013】

好適には、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とする。

好適な態様において、上記表皮中の遺伝子の発現の亢進は、表皮中の前記タンパク質の量を測定することにより決定される。

さらに好適には、上記測定は上記タンパク質に特異的な抗体を利用するELISA法又はRIA法により行われる。

別の好適な態様において、上記表皮中の前記遺伝子の発現の亢進は、表皮から抽出された前記タンパク質をコードするmRNAの量を測定することにより決定される。好ましくは、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行われる。

【0014】

第四の観点において、本発明は皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を上記遺伝子の発現及び／又はその遺伝子産物たるタンパク質の活性を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定する方法を提供する。

【0015】

好適な態様において、この方法は上記阻害能力を有するインヒビターをしみ形成モデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

【0016】

第五の観点において、本発明は皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、

表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm. 74656) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。

#### 【0017】

好適には、上記皮膚しみ形成はUVB照射を原因とする。

好適な態様において、上記表皮中の前記ポリヌクレオチドの発現の亢進は、表皮から抽出された前記当該ポリヌクレオチドに相補性のmRNAの量を測定することにより決定される。

好適には、上記mRNAの測定はポリメラーゼ連鎖反応法により行われる。

#### 【0018】

第六の観点において、本発明は皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法であって、候補化合物を表皮中の配列番号 1 に示す塩基配列から成るポリヌクレオチド (Mm. 74656) に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現を阻害する能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする方法を提供する。ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ. SambrookらMolecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10～40mM、好ましくは約20mM、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃であることを含む条件をいう。

#### 【発明の効果】

#### 【0019】

本発明により、皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法提供が可能となる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0020】

上述の通り、上記遺伝子に関し皮膚色素関連の報告は存在しない。本発明者は紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及びコントロールとしての紫外線照射を施していないモデルマウスの非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮において上記各遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出した。従って、これら遺伝子を遺伝子を指標とすることで、皮膚しみ形成を予知することができるものと推認できる。

#### 【0021】

#### しみモデルマウス

しみモデルマウスはM. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製することができる。簡単には、例えば7週齢前後のマウスに紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で約8週にわたり週約3回、99mJ/cm<sup>2</sup>程度の強度で紫外線照射する(UV照射期)。かかるUV照射期の間、皮膚の均一な色素沈着(皮膚の褐色化)が認められるようになる。この色素沈着はUV照射を止めてから2週間程度でほぼ完全に消失する(脱色期)。その後、直径約2mm以下の小さい、薄茶色の色素斑(いわゆる老人性色素斑様の「しみ」)が出現しはじめる(色素斑出現及び形成期)。

#### 【0022】

#### 皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法

本発明は、皮膚、好ましくはヒト皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMcp9、Mcp10、Isg15、Usp18、Oas12、Gbp2、Gtpi、Ifi47、Igt p、Tgt p、Sprr2A、Krt2-6b、Cdk5rap2、Mef2C、Gsta4、Osf2、Tnc、Igfbp6及びPpicapから成る群から選ばれる遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする。その評価基準として、例えば表皮中の上記遺伝子の発現がコントロール表皮中のそれらと比べ10%以上、



又は20%以上、又は30%以上、又は50%以上、又は70%以上、又は100%以上亢進していたなら「しみ形成のし易い皮膚である」と判断する、としてよい。

#### 【0023】

本発明は、また皮膚、好ましくはヒト皮膚しみ形成を予知するための皮膚検査方法であって、表皮中のMCP-6又はMm. 74656遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成のし易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。その評価基準として、例えば表皮中の上記ポリヌクレオチドの発現がコントロール表皮中のそれらと比べ10%以上、又は20%以上、又は30%以上、又は50%以上、又は70%以上、又は100%以上亢進していたなら「しみ形成のし易い皮膚である」と判断する、としてよい。

#### 【0024】

ハイブリダイゼーションは周知の方法又はそれに準じる方法、例えばJ. SambrookらMolecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989に記載の方法に従って行うことができ、そして高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、例えばナトリウム濃度が約10～40mM、好ましくは約20mM、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃であることを含む条件をいう。

#### 【0025】

検査すべき皮膚は、例えば顔、首、腕、肢など、しみができやすく、またしみ形成の気になるあらゆる部分の表皮であってよい。しみ形成のしない正常表皮、即ちコントロール表皮としては、例えば同一個体の例えば紫外線に曝されにくく、比較的しみのできにくい部位の表皮、例えば腹部、臀部の表皮であってよい。

#### 【0026】

表皮中の上記遺伝子の亢進は、例えば表皮中の当該遺伝子によりコードされるタンパク質の量を測定することにより決定される。好ましくは、この測定は上記タンパク質に特異的な抗体を利用し、当業界において周知の方法、例えば蛍光物質、色素、酵素等を利用する免疫染色法、ウェスタンブロット法、免疫測定方法、例えばELISA法、RIA法等、様々な方法により実施できる。また、表皮からRNAを抽出し、当該遺伝子をコードするmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

#### 【0027】

表皮中の上記遺伝子に対し高ストリンジェント条件下でハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドの発現は、表皮からRNAを抽出し、上記ポリヌクレオチドに対応するmRNAの量を測定することにより決定することもできる。mRNAの抽出、その量の測定も当業界において周知であり、例えばRNAの定量は定量ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）により行われる。

#### 【0028】

上述の通り、本発明は、紫外線照射を施したしみモデルマウスのしみ部位及び非しみ部位の各々の表皮由来のRNAのマイクロアレイ解析の結果、非しみ部位と比べ、しみ部位の表皮において上記遺伝子の発現が特異的に亢進されていることを見出したことに基づく。従って、表皮中の上記遺伝子の発現及び／もしくはその遺伝子産物たる上記タンパク質の活性を抑えることを指標として、皮膚のしみ形成を抑える及び／又は形成されたしみを除去することができる薬剤の開発が行えるものと推認される。

#### 【0029】

従って、本発明は上記遺伝子の発現を阻害するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として含んで成る医薬又は皮膚外用組成物を提供する。本発明に係る組成物は皮膚のしみ形成を予防又はしみを除去することができる。

#### 【0030】

本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、例えば水溶液、油液、その他の溶液、乳液、クリ

ーム、ゲル、懸濁液、マイクロカプセル、粉末、顆粒、カプセル、固形剤等の形態で適用される。従来から公知の方法でこれらの形態に調製したうえで、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤、水-油2層系、水-油-粉末3層系、注射剤、内服剤（錠剤、散剤、顆粒剤、丸剤、シロップ剤、トローチ剤等）、坐剤等として、身体に塗布、貼付、噴霧、注射、飲用、挿入することができる。当該組成物は上記インヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として、特に限定することなく、組成物全量に基づき例えば0.001mM~1M、好ましくは0.01~100mM、より好ましくは0.1~10mM程度含有するであろう。

#### 【0031】

これらの剤型の中でも、ローション製剤、乳液剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、エアゾール剤等の皮膚外用剤が、本発明の目的に適する剤型である。なお、ここで記す皮膚外用剤には、医薬品、医薬部外品（軟膏剤等）、化粧品〔洗顔料、乳液、クリーム、ジェル、エッセンス（美容液）、パック・マスク等の基礎化粧品；ファンデーション、口紅等のメーキャップ化粧品；口腔化粧品、芳香化粧品、毛髪化粧品、ボディ化粧品等〕が含まれる。特に本発明の医薬又は皮膚外用組成物は、しみ予防の化粧品としての適用が好適である。

#### 【0032】

本発明の医薬又は皮膚外用組成物においては、所望する剤型に応じて従来公知の賦形剤や香料等をはじめ、油脂類、界面活性剤、防腐剤、金属イオン封鎖剤、水溶性高分子、増粘剤、顔料等の粉末成分、紫外線防御剤、保湿剤、酸化防止剤、pH調整剤、洗浄剤、乾燥剤、乳化剤等が適宜配合される。さらにこの他の薬効成分を本発明の医薬又は皮膚外用組成物に配合することは、その配合により所期の効果を損なわない範囲内で可能である。

#### 【0033】

皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法

本発明はさらに、皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子をスクリーニングする方法も提供する。この方法は、候補化合物を上記遺伝子の発現及び／もしくはその遺伝子産物たる上記タンパク質の活性を抑える阻害能力について評価し、当該阻害能力を有するインヒビターを皮膚しみ形成抑制因子及び／又は皮膚しみ除去因子として選定することを特徴とする。

好適な態様において、上記スクリーニング方法は更に、上記阻害能力を有するインヒビターをしみモデル動物に適用し、皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果を有するインヒビターを選定することを含んで成る。

#### 【0034】

上記インヒビターの皮膚しみ形成抑制及び／又は皮膚しみ除去効果についての確認する工程はこのインヒビターをしみモデル動物、例えばしみモデルマウスを利用して実施することができる。動物としてはマウスの他にラット、ウサギなど様々な動物が利用できる。好適な態様においては、このインヒビターの溶液、例えば水溶液を調製してから皮膚しみモデル動物の皮膚に繰り返し塗布し、しみの形成を評価することで、上記効果の有無を判定することができる。

#### 【0035】

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0036】

##### しみモデルマウスの作製

しみモデルマウスはM. Naganuma et al., 前掲に記載の通りにして作製した。簡単には、7週齢のマウスの背部左半身に紫外光源(Toshiba FL-SE; UVB)の下で8週にわたり週3回、99mJ/cm<sup>2</sup>の強度で紫外線照射した(UV照射期)。背部右半身には紫外線照射をせず、その皮膚の表皮をコントロールとして用いた。週齢15~23週(UV照射期が終了して約8週まで)の間に脱色期を迎え、週齢23~35週(UV照射期が終了して約18~30週後)の間に色素

斑出現期を迎え、週齢35～52週（UV照射期が終了して約30～47週後）の間に色素斑形成期を迎えた。

#### 【0037】

##### 皮膚からのRNA採取

マウス背部の皮膚全層を採取、脂肪層を取り除き、加熱により表皮を剥離し、表皮をISOGEN（日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル）によりRNAを抽出、RNeasy（Qiagen社）により精製した。真皮の方は、1センチ角に切断して液体窒素で凍結し破碎後、ISOGEN（日本ジーン社、メーカー推奨プロトコル）によりRNAを抽出、RNeasy（Qiagen社）により精製した。RNAはTBEアガロースゲルで泳動し、SYBR green（Molecular probes社）で染色して品質、精製度を確認した。

#### 【0038】

##### マイクロアレイ用サンプルの反応

##### アジレント cDNAマイクロアレイ用サンプル

サンプルの調製及びハイブリダイゼーションはアジレント社推奨プロトコルに準じた。トータルRNA 10 $\mu$ gを、cDNAラベル化キット（アジレント社）を用いてラベル化cDNAを合成した。Qiaquick（Qiagen社、メーカー推奨プロトコル）にて精製後、Speed Vacにより溶媒を乾燥した。次に、マウス cDNAマイクロアレイキット（アジレント社、G410A）を用いてハイブリダイゼーション後、スライドガラスを洗浄した。アジレント社スキャナーによりデータ読み取りを行った。

#### 【0039】

##### 解析結果

約9,000種の遺伝子の発現を網羅的に解析した結果、しみモデルマウスの表皮において、コントロール表皮と比べ、下記遺伝子の発現が有意に亢進されていることが見出された。しみモデルマウスの表皮においてこれらの遺伝子の発現が亢進していることから、これら遺伝子を指標とすれば、将来しみが形成されることを予知できることとなる。以下の表にその発現亢進の結果を示す。

#### 【0040】

【表 1】

遺伝子名	シミ部位／非シミ部位 (n=4)
Mcp9	20.7
Mcp10	3.6
Isg15	4.1
Usp18	2.2
Oas12	4.1
Gbp2	3.3
Gtpi	3.2
Ifi47	2.8
Igtp	2.7
Tgtp	2.6
Spr2A	23.3
Krt2-6b	3.4
Cdk5rap2	12.4
Mef2C	4.8
Gsta4	3.0
Osf2	2.9
Tnc	2.9
Igfbp6	2.9
Ppicap	2.6
Mcp-6	1.8
Mm. 74656	2.9

## 【0041】

シミモデルマウスのシミ部位と正常部位の表皮タンパク質を抽出し、図1に示す主要なシグナルタンパク群の発現量をウエスタンブロットにより調べたところ、リン酸化STAT1が特にシミ部位／正常部位で大きな発現差を示していた。この結果はインターフェロン誘導遺伝子群がシミ部位で亢進していることと整合性がある。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0042】

【図1】ウエスタンブロットによる主要なシグナルタンパクのシミ部位と正常部位での発現差を示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Shiseido Co. Ltd.

&lt;120&gt; Methods for Predicting Skin Stain Formation and for Screening Agent Capable of Inhibiting Skin Stain Formation By Means of Promoted Genes in Stained Regions as an Indicator

&lt;130&gt; 1033905

&lt;160&gt; 1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;212&gt; DNA

&lt;223&gt; Mm. 74656

&lt;400&gt; 1

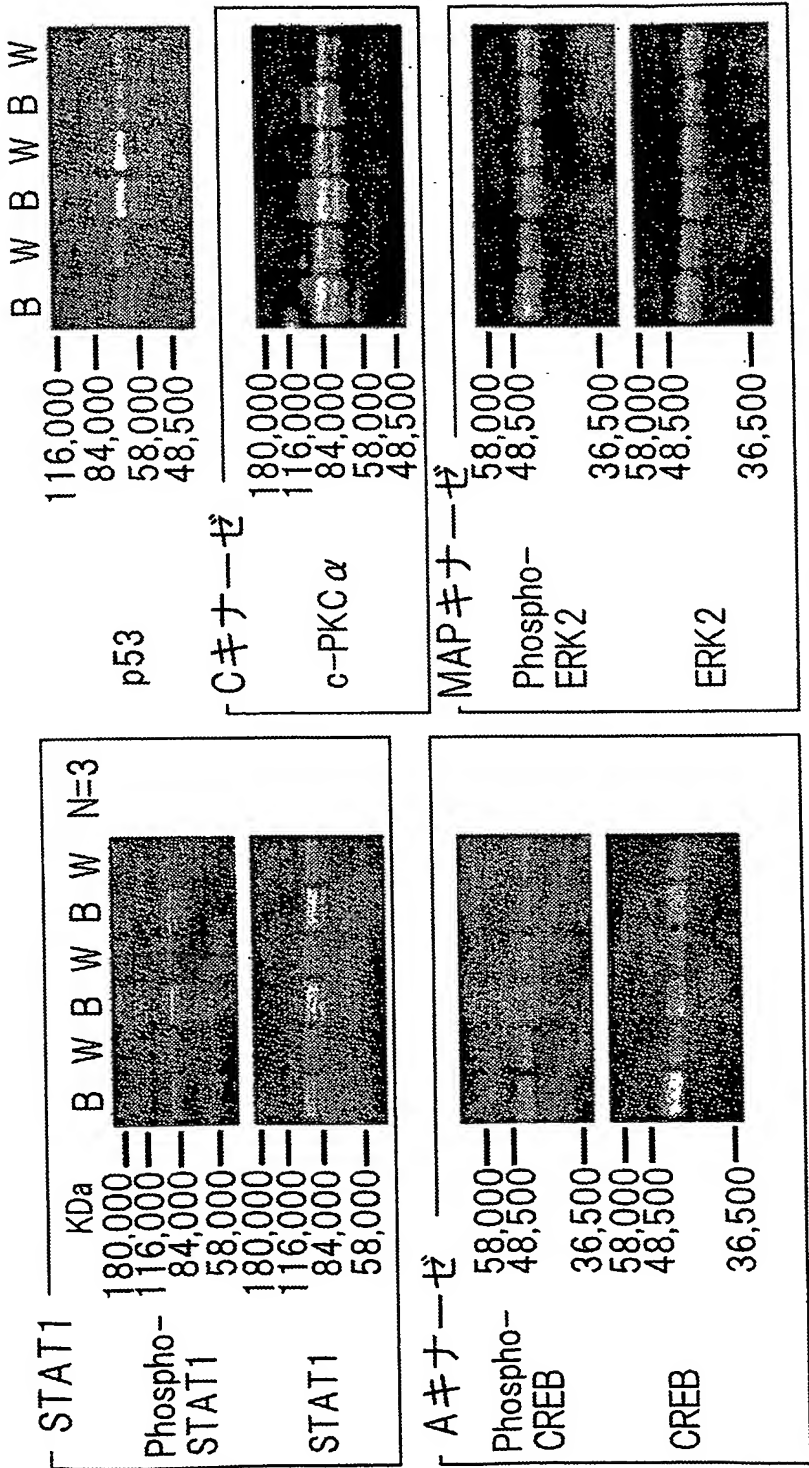
ttcgtcgaca tgctcagcaa ccaatagaga tcaagcaaag gccaatcaaa tggattgatt	60
ggtgctatga acaacaccat caatcaactt gatttaattg gcattaattg aatattctag	120
ccagcaggac aatactcatt ctctttgagc tcaccaaaaa caaacaaca aacaaacatt	180
caccagggtta cgcattgagc cactaaacat gcttgatttg gtttcatcat gacaaaaata	240
aaacgttatg ttttttttcc agaacaataa tattacaaag catattcttg ggtcaccata	300
aatttaaagt acaaaccaat agccccccc caaaaaagga aacaaaaaat gtaaataattt	360
ggaaatttaa caacacactt taaccaataa tttaaagaag tcataagata aattttgtat	420
ctcaaaagta aataaaattc aaaacacaat gtgtgctgga tgcagtgaaa gcatcatttg	480
taaggacatt tacattaggt gcttagaaga gaagcgtgct ctgaaagcaa tagtgtccct	540
gtcatagagt actataaaag gcacgaagaa tagaaaacaa aaatttta	588

【書類名】 図面  
【図 1】

図 1

B: 色素斑部位  
W: 正常部位

主要なシグナル伝達系タンパク群の発現比較



特にSTAT1のリン酸化 (Phospho-STAT1)が色素斑部位で亢進している。

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 皮膚しみ形成を予測するための皮膚検査方法の提供。

【解決手段】 本発明は、皮膚しみ形成を予測するための皮膚検査方法を提供する。この方法は、表皮中のMcp9、Mcp10、Isg15、Usp18、Oas12、Gbp2、Gtpi、Ifi47、Igt p、Tgt p、Sprr2A、Krt2-6b、Cdk5rap2、Mef2C、Gsta4、Osf2、Tnc、Igfbp6、Ppicap、MCP-6又はMm. 74656遺伝子の発現が正常な表皮中の発現に比べて亢進している場合、しみ形成し易い皮膚であると判断することを特徴とする方法を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 4 4 7 8 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 5 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号

氏 名

株式会社資生堂